

無題

1/7/4
DIALOG(R) File 350:Derwent WPIX
(c) 2006 The Thomson Corp. All rts. reserv.

013242954 **Image available**

WPI Acc No: 2000-414836/200036

Novel macro-complex useful in assays for, e.g. folate, formed by attaching bioatinylated ligand binder molecules to biotinylated carrier molecules via streptavidin

Patent Assignee: ORTHO-CLINICAL DIAGNOSTICS (ORTH-N); ORTHO CLINICAL DIAGNOSTICS (ORTH-N)

Inventor: DAWKES A C

Number of Countries: 029 Number of Patents: 005

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 1016865	A2	20000705	EP 99310246	A	19991220	200036 B
AU 9965283	A	20000622	AU 9965283	A	19991216	200036
JP 2000187035	A	20000704	JP 99357182	A	19991216	200037
NO 9906329	A	20000622	NO 996329	A	19991220	200041
CA 2292358	A1	20000621	CA 2292358	A	19991215	200044

Priority Applications (No Type Date): GB 9828192 A 19981221

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

EP 1016865 A2 E 8 G01N-033/50

Designated States (Regional): AL AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT
LI LT LU LV MC MK NL PT RO SE SI

AU 9965283 A G01N-033/82

JP 2000187035 A 6 G01N-033/547

NO 9906329 A G01N-033/543

CA 2292358 A1 E G01N-033/82

Abstract (Basic): EP 1016865 A2

NOVELTY - Macro-complex formed (I) by attaching at least 1 bioatinylated ligand binder molecules via streptavidin to at least 1 biotinylated carrier molecule, where the complex has more free biotin moieties than ligand binding sites and can be immobilized onto a solid support, is new.

DETAILED DESCRIPTION - An INDEPENDENT CLAIM is also included for a method for performing an assay using (I).

USE - The complexes are useful for preforming assays, especially detecting vitamin B12, and/or folate.

ADVANTAGE - The active components are chemically coupled together and the number of immunocomplexes that can be immobilized on a solid support is increased in analyte binder-soluble matrix backbone complexes. The methods produce complexes to an enhanced efficiency and reproducibility and give improved assay precision and clinical performance.

pp; 8 DwgNo 2/1

Derwent Class: B04; J04; S03

International Patent Class (Main): G01N-033/50; G01N-033/543; G01N-033/547; G01N-033/82

International Patent Class (Additional): G01N-033/53; G01N-033/68

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-187035

(P 2000-187035 A)

(43) 公開日 平成12年7月4日(2000.7.4)

(51) Int. Cl.

G01N 33/547
33/82

識別記号

F 1

G01N 33/547
33/82

テマコード (参考)

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平11-357182

(22) 出願日 平成11年12月16日(1999.12.16)

(31) 優先権主張番号 9828192 : 6

(32) 優先日 平成10年12月21日(1998.12.21)

(33) 優先権主張国 イギリス (GB)

(71) 出願人 597039249

オーソークリニカル ダイアグノスティクス

イギリス国、バッキンガムシャー エイチ
ピー7 0エイチジェイ、アマーシャム、
ザ ブロードウェイ 62、マンデビル ハ
ウス

(72) 発明者 エイドリアン チャールズ ダウクス

イギリス国、パークシャー エスエル4
3ピーエフ、ウインザー、カレッジ クレ
セント 15

(74) 代理人 100077517

弁理士 石田 敬 (外4名)

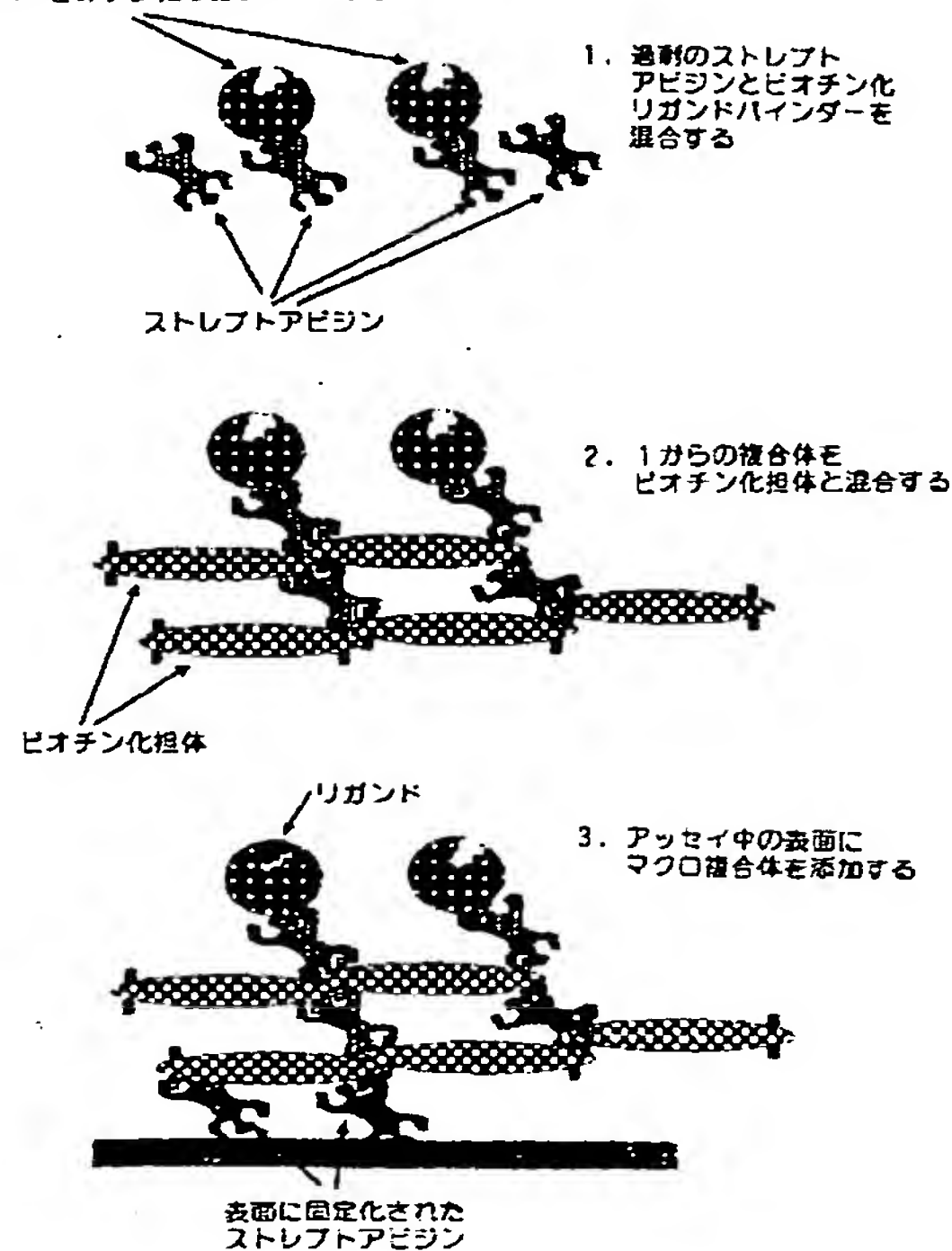
(54) 【発明の名称】 ビオチン化リガンドバインダーを含んで成るマクロ複合体

(57) 【要約】

【課題】 アッセイ精度の改善とそれによって臨床性能の改善を提供するであろうリガンドバインダー捕捉系の効率と再現性の改善が必要である。

【解決手段】 ストレプトアビジンを介して1または複数のビオチン化リガンドバインダー分子を1または複数のビオチン化担体分子に結合させることにより形成されたマクロ複合体であって、リガンド結合部位よりも多数の遊離型ビオチン成分を有し且つ固体支持体上に固定化することができるマクロ複合体、およびそれを使ったアッセイの実施方法が提供される。

図1 ビオチン化リガンドバインダー



【特許請求の範囲】

【請求項1】 ストレプトアビジンを介して1または複数のビオチン化リガンドバインダー分子を1または複数のビオチン化担体分子に結合させることにより形成されたマクロ複合体であって、リガンド結合部位よりも多くの遊離型ビオチン成分を有し且つ固体支持体上に固定化することができるマクロ複合体。

【請求項2】 前記ビオチン化リガンドバインダーがビオチン化されている内因子であり、そして前記ビオチン化担体がビオチン化されているウシ血清アルブミンであり、そしてビオチン化内因子とビオチン化ウシ血清アルブミンがストレプトアビジンを介して互いに結合している、請求項1に記載のマクロ複合体。

【請求項3】 前記ビオチン化リガンドバインダーがビオチン化されている葉酸結合タンパク質であり、そして前記ビオチン化担体がビオチン化されているウシ血清アルブミンであり、そしてビオチン化葉酸結合タンパク質とビオチン化ウシ血清アルブミンがストレプトアビジンを介して互いに結合している、請求項1に記載のマクロ複合体。

【請求項4】 請求項1に記載のマクロ複合体を使ったアッセイの実施方法。

【請求項5】 請求項2に記載のマクロ複合体を使ったビタミンB12についてのアッセイの実施方法。

【請求項6】 請求項3に記載のマクロ複合体を使った葉酸についてのアッセイの実施方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、ストレプトアビジンを介して1または複数のビオチン化リガンドバインダー分子を1または複数のビオチン化担体分子に結合することにより形成されたマクロ複合体に関する。本発明はまた、前記マクロ複合体を使ったアッセイの実施方法にも関する。

【0002】

【従来の技術】 体液中の生物学的および化学的存在物の検出と測定は、広範囲の臨床状態の診断と監視に利用されている。比較的短い時間内に適当な臨床情報を提供することが望ましい。従って、この種の情報を提供するアッセイを数分間以内に終了できることが重要である。

【0003】 分析物 (analyte) と1または複数の特異的バインダーとの結合反応を使用することに基づいた測定は周知であり、それは長年に渡り使われている。特異的結合反応の二成分はしばしばリガンドとリガンドバインダーと呼ばれ、またはリガンドが測定しようとする分析物である場合には分析物と分析物バインダーと呼ばれる。この二成分は、互いに特異的に結合することができ、ある範囲の分析法の基礎を構成している。特異的結合反応を利用する多くのアッセイでは、分析物か分析物バインダーのいずれかが検出可能な基により標識され

る。競合結合アッセイでは、標識された分析物が分析物バインダーへの結合を目当てに試料中の分析物と競争する。別のタイプの結合アッセイでは、標識された分析物バインダーが、試料中の分析物および第二の分析物バインダーとの反応に使われる。どちらのタイプのアッセイでも、分析物濃度に依存して、標識反応体が未標識の分析物バインダーと結合された状態になる。この複合体中の標識反応体の測定が、試料中の分析物の濃度の概算を与える。

【0004】 標識反応体がアッセイ中に固相表面上に固定化された分析物バインダーに結合された状態になる固相アッセイでは、特異的バインダーに結合した標識反応体を、未結合の標識反応体から容易に分離することが可能である。固相アッセイでは、固相に結合された形態かまたは液相中に存在する形態のいずれかの標識反応体の量が、試料中に存在する分析物の量の尺度を提供する。

【0005】 固相への分析物バインダーの可逆的結合を達成するための無関係のリガンドの結合による分析物バインダーの改変は、米国特許第4,271,140号明細書に記載されている。

【0006】 生物活性表面の機能性レベルの更なる改善はビオチン-ストレプトアビジン結合およびビオチン-アビジン結合を使って達成されており、この場合、ビオチン化リガンドバインダーは固相上に固定されたアビジンまたはストレプトアビジンにより捕捉される。これらの改善は刊行物中で十分証明されている (Butler他, 1992; Davies他, 1993; Davies他, 1994)。

【0007】 リガンドを担持する可溶性マトリックスまたは主鎖に分析物バインダーが化学的に結合されている複合体の形成は、米国特許第4,778,751号明細書に記載されている。アッセイ中に複合体を固相上に固定化するために前記リガンドが用いられている。この構造の複合体を使用する利点は、活性成分が一緒に化学的に結合されることと、固体支持体上に固定化できる免疫複合体の数が増加することである。これは、複合体中のリガンド分子の数に比較した複合体中の分析物バインダーの数の比が高いことによる。活性成分がビオチン-ストレプトアビジン結合を利用して互いに連結している複合体の使用は開示されていない。競合結合アッセイにおける乏しいアッセイ感度と精度の問題も検討されていない。

【0008】 特異的結合相手を使用し、適当な動的範囲、感度および臨床性能を有する迅速なアッセイを獲得するためには、系内の分析バインダーの量を制限することがしばしば望ましい。これは、試料中の分析物と標識分析物との競合結合方式を頼みにするアッセイに特に当てはまる。分析物バインダーの固相捕捉を頼みにする系では、アッセイを実施するのに利用できる時間内に平衡が達成されない場合がある。結果として、アッセイの特定終了時点における固相により捕捉された分析物バインダーの量の変量が小さいので、分析物バインダーに結合

した標識分析物の検出の際に許容できない偏差を引き起こし得る。これは結果的にアッセイの乏しい再現性と感度になる。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】ビオチン化リガンドバインダーを使うアッセイでは、アッセイを完結するのに利用可能な時間が制限される場合は特に、精度（一緻性）を得るために最終的に固相上に固定化されたストレプトアビジンにより捕捉されるビオチン化リガンドの量を制御することは困難である。ビオチン化リガンドバインダーが低濃度で要求される場合（例えば競合結合アッセイ方式では）またはリガンドバインダーがストレプトアビジンへの結合に利用可能である少数の結合したビオチン成分を有する場合、ビオチン化リガンドバインダーの捕捉の制御もまた困難である。よって、アッセイ精度の改善とそれによって臨床性能の改善を提供するであろうリガンドバインダー捕捉系の効率と再現性の改善が依然として必要とされている。

【0010】

【課題を解決するための手段】本出願人は、常用の手段よりも大きい効率と再現性によりアッセイ精度と感度を改善する手段を獲得した。本発明の1つの目的は、ビオチン化リガンドバインダー（B-LB）をストレプトアビジン（SAV）に連結して複合体形成し、続いて表面に多数の遊離の（未結合の）ビオチン成分、例えばビオチン化ウシ血清アルブミン（B-BSA）を有するビオチン化担体分子（B-CAR）にこれを連結して複合体形成することにより、大きい効率と再現性によってアッセイ精度と感度を改善するのに有用なマクロ複合体を提供することである。このマクロ複合体は次いで、それが固定化ストレプトアビジン表面と接触するように溶液中に提供することができる。マクロ複合体は、アッセイを実施する前に予備形成でき、またはその場で形成させることができる。好ましい態様は、ビオチン-ストレプトアビジン結合を介して1または複数の担体分子に1または複数のリガンドバインダー分子を連結することにより形成されたマクロ複合体であり、このマクロ複合体はリガンド結合部位よりも多数の遊離型ビオチン成分を有し、且つ固体支持体上に固定化することができる（図1参照）。

【0011】本発明の別の態様は、前記マクロ複合体を使ったアッセイの実施方法に関する。好ましい態様は、前記マクロ複合体を使ったビタミンB12または葉酸についてのアッセイの実施方法に関する。

【0012】

【発明の実施の形態】「リガンドバインダー」は、リガンドに特異的に結合できる任意の分子であることができる。典型的には、リガンドバインダーは、試料中の着目の分析物をまたはその標識類似体を結合することができる。リガンドバインダーは典型的には、結合タンパク

質、例えば内因子、葉酸結合タンパク質、ステロイド結合タンパク質もしくは特異的レセプター、または前記のいずれかの断片もしくは誘導体であろう。リガンドバインダーは特異的結合ペアの二成分の大きい方または小さい方の成分であることができ、他方の成分はリガンドであることができる。本発明では、リガンドバインダーが結合ペアの大きい方の成分または小さい方の成分のいずれであってもよい。好ましいリガンドバインダーは内因子である。

【0013】「担体」は、ビオチン-ストレプトアビジン結合を介してリガンドバインダーに直接または間接的に結合することができる分子またはポリマーを意味する。好ましい担体は、それに複数のビオチン分子を担持できるものであろう。担体は天然のものであっても合成のものであってもよい。好ましい担体はウシ血清アルブミン（BSA）である。

【0014】担体へのリガンドバインダーの結合を促進するために、リガンドバインダーと担体分子をビオチンの化学的結合によって改変することができる。ビオチンを別の分子に結合する方法は当該技術分野で周知である。例えば、Savage, M.D., 1996, "An Introduction to Avidin-Biotin Technology and Options for Biotinylation.", A Laboratory Guide to Biotin-Labeling in Biomolecule Analysis, T. Meier & F. Fahrenholz編, Pubs. Birkhauserを参照のこと。

【0015】ストレプトアビジンを固体支持体に固定化する方法は当該技術分野で既知である。コーティング技術としては、例えば、化学的結合または物理的吸着が挙げられる（M. Suter & J.E. Butler, 1986, Immunology Letters, 第13巻, 313-316頁）。

【0016】測定しようとする分析物の適当な標識類似体または標識バインダーの選択は当業者の技術の範囲内である。適当な標識としては放射性同位体、酵素および蛍光または化学発光分子が挙げられ、そして分析物分子またはバインダーを標識する方法は当該技術分野で周知である。好ましい標識は西洋ワサビペルオキシダーゼ酵素である。

【0017】固体支持体は任意の支持体または表面であることができ、例えば、マイクロウェル、ゲル、膜、粒子、ビーズまたはディップスティックであることができる。当業者は、どんなタイプの支持体を実施するアッセイに最も適するかを知っているだろう。

【0018】本発明では、ビオチン-ストレプトアビジン結合を記載する場合は常に、ビオチン-アビジンも同等に使用できることを理解すべきである。当業者は与えられた状況にどの物質がより適切であるかを理解するだろう。同様にマクロ複合体はアッセイの実施前にまたはその場で形成させることができる。

【0019】本発明の一態様は、低濃度のB-LBをモル過剰のSAVと連結せしめて（B-LB）-（SA

10

20

30

40

50

V)、複合体を形成させるものである。SAVに対比してモル過剰のビオチン化担体の付加および複合体形成の誘導は、複合体の重合を生じ、様々なサイズと組成の

(B-LB)-(SAV)、-(B-CAR)、マクロ複合体を提供する(図1参照)。増加した質量と固定化SAVに結合できる多数の遊離型ビオチン成分を有する巨大分子が生成する。複合体形成していないB-LBと比較して、これらの分子の捕捉の効率と再現性は増大する。

【0020】機能的な分析物結合分子の質量を増加させ、その一方でSAV表面への結合に利用可能なビオチンの数を増加させることは、二元的な効果を有する。質量の増加は、表面に拡散するのにより長時間かかるであろうから、複合体がより長時間液相中に保持されることを意味する。これは、液相/固相相互作用に比較して液相中でアッセイが行われる時間の相対量を増加させる。この場合、B-LBへの分析物結合の反応速度論は、表面に固定化されたB-LBへの分析物結合のものよりも有利である。一旦複合体が表面に拡散すると、マクロ複合体上のビオチンの数の増加のためにビオチン-ストレプトアビジン結合を介した捕捉を生じる表面との相互作用の確率が増加する。全体のアッセイ反応時間は、マクロ複合体の使用により有意に影響を受けないようである。

【0021】上述した複合体は、たとえ利用可能なビオチン分子の質量と数の同様な増加を達成できるとしても、担体分子に化学的に結合したリガンドバインダーよりも有利であると思われる。「化学的に結合した」とは、リガンドバインダーと担体とが共有結合によって互いに結合しており、特異的結合反応によってではないことを意味する。特異的結合分子同士は、活性エステルと異種二価性(heterobifunctional)試薬または当該技術分野で周知である他の試薬を使って、互いに化学的に結合することができる。化学的結合を使った時に遭遇する問題は、担体に化学的に結合したリガンドバインダー分子の数の点で、または結合後に機能的なままであるリガンドバインダー分子の比率に関して、結合に再現性がないことである。

【0022】化学的結合の後の複合体中のリガンドバインダーの量の測定は、非常に困難である。生物学的成分はしばしば分光学的手段により分析され、そして複合体中のリガンドバインダーと他の成分が類似した物質である場合、例えばタンパク様物質である場合、複合体中の他の成分からリガンドバインダーを区別することは困難である。よって、アッセイへのリガンドバインダーの正確な活性の付加は、滴定によってしか行えない。この工程は誤差を生みやすく、異なる場合におけるアッセイ時のリガンドバインダーの活性に差を与え得る。これはアッセイの乏しい再現性を引き起こす。(B-LB)-(SAV)、-(B-CAR)、ルートによるマクロ複

合体の形成は、マクロ複合体の個々の成分の濃度と活性に対する制御を可能にする。意外にも、リガンドバインダー部位に対して高比率の遊離型ビオチン成分を含有するマクロ複合体が、ストレプトアビジン固相上へのマクロ複合体の固定化をより再現性あるものにすることがわかった。好ましいマクロ複合体は、ビオチン化ウシ血清アルブミン28部に対して、ストレプトアビジン16部、ビオチン化内因子約1部のモル比を含む。

【0023】

10. 【実施例】実施例1

ビオチン化内因子含有マクロ複合体(本発明の方法)またはビオチン化内因子(従来の方法)を使ったストレプトアビジン被覆マイクロウエル上でのビタミンB12アッセイ

【0024】I) ビタミンB12アッセイで使用されるビオチン化内因子マクロ複合体の調製

1. 使用した希釈緩衝液は、0.01%重量/容量(w/v)シアン化カリウム、0.5%(w/v)ウシ血清アルブミン(BSA)および保存剤としての0.5容量%(v/v)BRONIDOX-Lを含有する脱イオン水中の0.1Mリン酸ナトリウム、pH 7.0であった。

2. Savage, M.D., 1996(上記参照)に記載された方法により、ビオチン-LC-NHS(Pierce and Warriner, Chester, U.K.)を使って内因子をビオチン化し、そしてビオチン-XX-NHS(Calbiochem, Beeston, U.K.)を使ってウシ血清アルブミン(BSA)をビオチン化した。

【0025】3. ビオチン化内因子(B-IF)とストレプトアビジンを、24 ng/mlのB-IFおよび0.5 μg/mlのストレプトアビジンと希釈緩衝液中で混合した。この混合物を2~8℃で少なくとも18時間放置して平衡化させた。

4. 上記(B-IF)-ストレプトアビジン複合体に1.0 μg/mlのビオチン化BSAを添加し、そして室温で1時間インキュベートした。

【0026】比較用試薬(従来の方法)は、希釈緩衝液中24 ng/mlの複合体化していないビオチン化内因子(B-IF)であった。

【0027】II) ビタミンB12アッセイプロトコール

1. 試験管に次のものを添加した:

- 150 μl の試料またはビタミンB12を含有する標準血清

- 50 μl の安定剤(脱イオン水中の1.6 %w/v ジチオトレートール)

- 100 μl の変性剤(0.01%w/v シアン化カリウム、0.15M四ホウ酸二ナトリウム、0.01%w/v Mordant Orange色素を含有する、脱イオン水中の0.85M水酸化ナトリウム)

2. 溶液を混合しそして室温で15時間インキュベートした。

【0028】 3. 100 μ l の中和剤 (30 mM ヨウ化ナトリウム、2.5 %v/v TRITON X-100、0.01%w/v 薬用消泡剤C (Medical anti-form C) を含有する脱イオン水中の0.6Mホウ酸) を添加した。

4. 生じた溶液を再び混合した。

5. この溶液60 μ l をVITROS Eciストレプトアビジン被覆マイクロウエル (Ortho-Clinical Diagnostics社製) に移した。

【0029】 6. ビタミンB12-西洋ワサビペルオキシダーゼ接合体、0.5 % (w/v) ヒト血清アルブミン、5 % (w/v) ショ糖、保存剤としての0.5 % (w/v) クロロアセトアミドおよび0.05%薬用消泡剤Cを含有する、脱イオン水中の0.1 Mリン酸カリウム緩衝液50 μ l を添加した。ビタミンB12-西洋ワサビペルオキシダーゼ接合体は、ビタミンB12モノカルボン酸異性体の混合物を使って、米国特許第4,465,775 明細書に記載の方法に従って調製した。

【0030】 7. 上記のように調製したB-I FまたはB-I Fマクロ複合体試薬 50 μ l も添加した。

8. 次いで混合物を37℃で30分間インキュベートした。

9. 次いで、VITROS Eci洗浄試薬を使ってマイクロウエルを洗浄し、そしてVITROS Eciシグナル試薬の各部 100 μ l を添加した。

10. 各マイクロウエルから放射される発光をVITROS Eci分析装置 (Ortho-Clinical Diagnostics) を使って測定した。

【0031】 アッセイインキュベーションの間に、ビタミンB12-西洋ワサビペルオキシダーゼ接合体がB-I

F (従来の方法) またはマクロ複合体中のB-I F (本発明の方法) により結合され、それがビオチン化内因子上のビオチンとウエル上のストレプトアビジンとの反応

(従来の方法) またはマクロ複合体上のビオチンとウエル上のストレプトアビジンとの反応 (本発明の方法) により、マイクロウエル表面上に固定化された状態になる。

マイクロウエルを洗浄した後、増強発光反応 (米国特許第5,372,931 号明細書に記載) を使って、固定化されたビタミンB12-西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体の活性を測定する。VITROS Eciシグナル試薬は、発光生成基質 (ルミノール誘導体と過酸塩) および電子移動剤を含有する。結合した複合体中の西洋ワサビペルオキシダーゼはルミノール誘導体の酸化を触媒して光を生成する。電子移動剤 (置換アセトアニリド) は、生成する光のレベルを増加させそしてその発光を延長する。

【0032】 図2は、本発明の方法を用いた、0 pg/ml から2000 pg/mlまでの範囲にわたるビタミンB12アッセイについての用量応答曲線を示す。

【0033】 実施例2

ビタミンB12アッセイの感度

ビタミンB12アッセイの感度は、0 pg/mlのビタミンB12標準液の平均光シグナルから20複製物を使って算出された標準偏差 $\times 2$ を引いたものに等しい、ビタミンB12濃度である。従来の方法と本発明の方法を使ったビタミンB12アッセイの感度を表1に示す。

【0034】

【表1】

B-I F のタイプ	平均光単位 0 pg/ml ビタミンB12	光単位 CV (%)	感度 (pg/ml)	血清試料 平均 ビタミンB12 (pg/ml)	ビタミンB12 CV (%)
B-I F	1078	5.2	62.5	450	11.5
マクロ 複合体	1056	1.6	14.9	510	2.9

【0035】 表1から、従来の方法の感度が62.5 pg/mlであったことがわかる。本発明の方法を使った感度は14.9 pg/mlであった。本発明の新規ビタミンB12アッセイでは固相上へのマクロ複合体の固定化の再現性の改善の結果、ビタミンB12アッセイの検出感度の改善が得られる。

【0036】 実施例3

ビタミンB12アッセイの精度

正常レベルのビタミンB12を含有する血清試料を、従来の方法を使って20回、そして本発明の方法を使って20回アッセイした。それらの結果も表1に示す。ビタミンB12の平均レベルは、従来の方法では 450 pg/mlでありそして本発明の方法では 510 pg/mlであることがわかった。血清試料中のビタミンB12の測定値の変動係数 (C

V%) は、従来の方法では11.5%でありそして本発明の方法では2.9 %であった。本発明の新規ビタミンB12アッセイにおける固相上へのマクロ複合体の固定化の再現性の改善は、結果としてアッセイにおけるビタミンB12の測定精度の改善をもたらした。

【0037】

【発明の効果】 結論として、本発明のマクロ複合体方法論は、改善されたアッセイ感度と精度を示す。

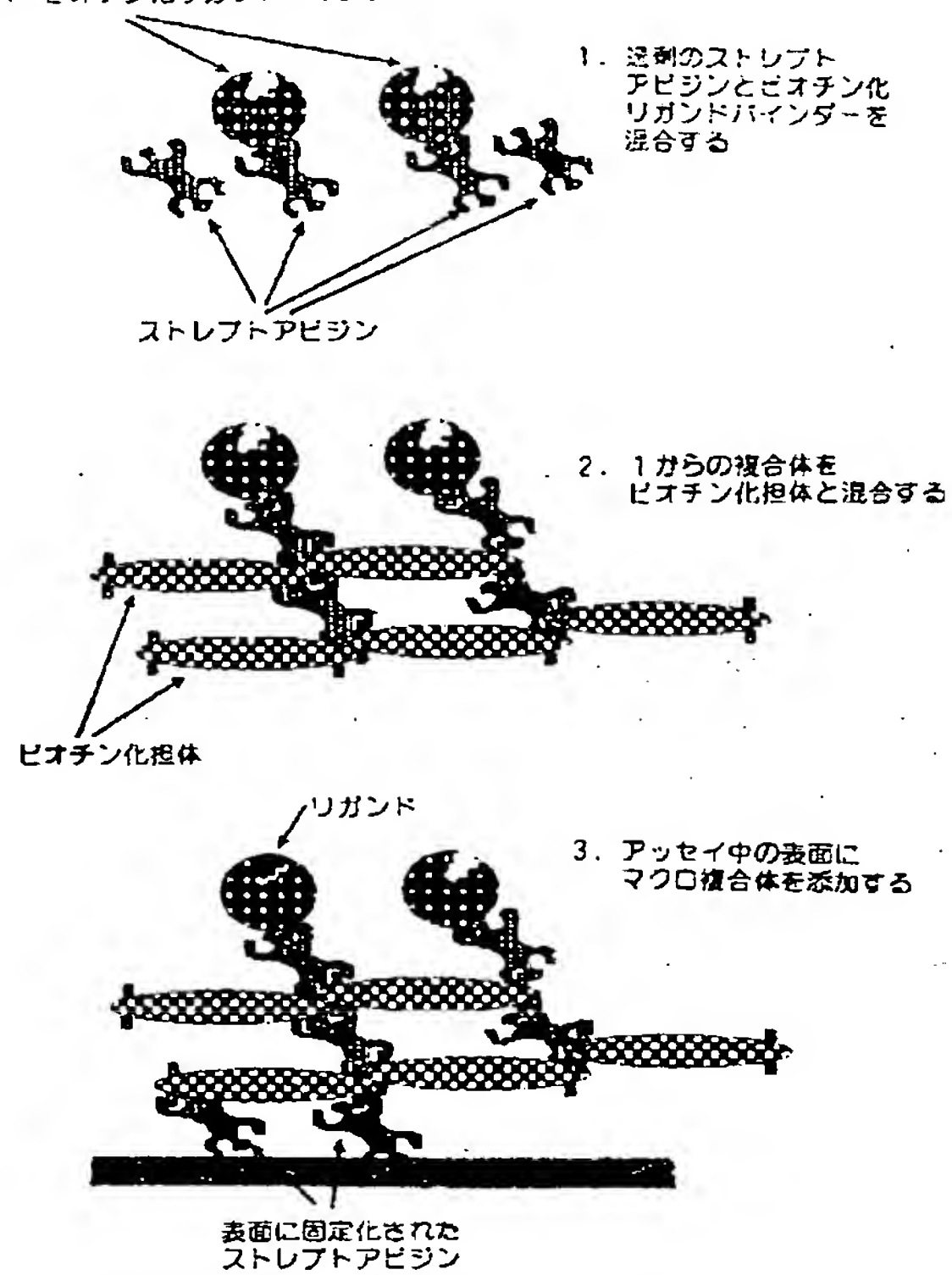
【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、ビオチン化リガンドバインダー、ビオチン化担体およびストレプトアビジンを含んで成るマクロ複合体である。

【図2】 図2は、改善された精度と感度を示すビタミンB12の用量応答曲線である。

【図1】

図1 ビオチン化リガンドバインダー



【図2】

図2

